

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-354699

(43)Date of publication of application : 25.12.2001

(51)Int.Cl. C07K 16/18
C12N 5/10
C12N 15/02
G01N 33/53
G01N 33/577
// C12P 21/08
(C12N 5/10
C12R 1:91)
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 2000-174995

(71)Applicant : TEIJIN LTD

(22)Date of filing : 12.06.2000

(72)Inventor : KURI YUICHI

KAWAMURA TAKASHI

ZANMA AKIRA

KAMIMURA TAKASHI

(54) ANTIBODY BINDING TO ANGIOTENSIN II

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a monoclonal antibody binding to angiotensin 11 useful for detection and measurement of angiotensin 11 and diagnosis based on the detection and measurement and further for treatment of cardiovascular diseases.

SOLUTION: This monoclonal antibody binds to angiotensin 11 produced from a hybridoma cell obtained by cell fusion of lymphocyte obtained by immunizing angiotensinogen knock-out animal with angiotensin 11 with a myeloma. An animal cell produces the above monoclonal antibody.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-354699

(P2001-354699A)

(43) 公開日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト ⁸ (参考)
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 4
15/02		33/577	B 4 B 0 6 5
G 0 1 N 33/53		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
33/577		C 1 2 R 1:91)	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-174995(P2000-174995)	(71) 出願人	000003001 帝人株式会社 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号
(22) 出願日	平成12年6月12日(2000. 6. 12)	(72) 発明者	九里 裕一 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
		(72) 発明者	河村 隆 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
		(74) 代理人	100077263 弁理士 前田 純博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンギオテンシンⅡと結合する抗体

(57) 【要約】

【課題】 アンギオテンシンⅡの検出、測定ならびにそれに基づいた診断、さらには心血管系疾患の治療に有用な、アンギオテンシンⅡと結合するモノクローナル抗体を提供する。

【解決手段】 アンギオテンシノーゲンノックアウト動物にアンギオテンシンⅡを免疫して得られるリンパ球と、ミエローマとの細胞融合によって得られるハイブリドーマ細胞から産生される、アンギオテンシンⅡと結合するモノクローナル抗体。また、かかるモノクローナル抗体を産生する動物細胞。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アンギオテンシンノーゲンノックアウト動物にアンギオテンシンIIを免疫して得られるリンパ球と、ミエローマとの細胞融合によって得られるハイブリドーマ細胞から産生される、アンギオテンシンIIと結合するモノクローナル抗体。

【請求項2】 請求項1に記載のモノクローナル抗体を産生する動物細胞。

【請求項3】 ハイブリドーマ細胞またはハイブリドーマ細胞から誘導される細胞である請求項2に記載の動物細胞。

【請求項4】 ノックアウト動物に当該ノックアウト遺伝子産物を免疫して得られるリンパ球とミエローマとの細胞融合によって得られるハイブリドーマ細胞から産生される、当該ノックアウト遺伝子産物に結合するモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はアンギオテンシンIIと結合するモノクローナル抗体、およびかかる抗体を用いたアンギオテンシンIIの検出・測定系、ならびに診断薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 アンギオテンシンIは10アミノ酸からなるペプチド ($\text{NH}_2\text{-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-COOH}$) であり、前駆体蛋白質であるアンギオテンシンノーゲンから、レニンによるプロセッシングによって生成される。さらにアンギオテンシンIはアンギオテンシン変換酵素 (ACE) によりプロセッシングを受け、8アミノ酸からなるアンギオテンシンII ($\text{NH}_2\text{-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH}$) に変換される。アンギオテンシンIIは特異的受容体を介し、血管平滑筋収縮、腎臓糸球体メサンギウム細胞の収縮、腎糸球体輸出入細動脈の収縮、近位尿管のナトリウム再吸収促進、副腎アルドステロン分泌亢進等、血圧調節や水・電解質代謝に直接的作用をもつことが明らかとなっている。また近年、上記の作用とは別にアンギオテンシンIIは増殖因子としての作用をもつことが明らかとなってきた。すなわち、培養細胞を用いた検討やアンギオテンシン受容体拮抗薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬を用いた薬理学的検討から、アンギオテンシンIIは心血管・腎組織の構成細胞に対し特異的レセプターおよび細胞内情報伝達系を介して、増殖・細胞外基質合成促進・肥大作用等、多様な生物活性を有することが明らかとなっている (Science, 245, 186 (1989), Journal of Cardiovascular Pharmacology, 19 (suppl. 1), S51 (1992), Kidney International, 40, 583 (1991))。これらの知見から、アンギオテンシンIIは高血圧はもとより心肥大、動脈硬化症、心筋梗塞症、腎

糸球体硬化症などの循環系増殖性疾患に関与していると考えられている。

【0003】 以上のように、アンギオテンシンIIは生理的、病態生理学的に極めて重要な因子であり、生体組織におけるその検出、測定系は医療診断、医学研究において重要である。現在、アンギオテンシンIIの測定手法としては、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を用いた放射性同位体ラジオイムノアッセイ法 (Journal of Cardiovascular Pharmacology, 8 Suppl 10: S23-8 (1986), Biochemical Biophysical Research Communication 143(1): 133-9 (1987)) およびポリクローナル抗体を用いたエンザイムイムノアッセイ (Peninsula社, EIA for Angiotensin II (Human), EIAH-7002) が一般的である。しかしこれらの方法は、放射性同位体を用いること、高コストであることなどから、より簡便で安価な測定系が望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、より簡便なアンギオテンシンの測定系に必要とされる抗アンギオテンシンモノクローナル抗体を取得することである。そうした抗体を用いることにより、アンギオテンシンを含む検体サンプルのより大量、短時間、安価な測定が可能となることが期待される。また、アンギオテンシンIIに結合することによりアンギオテンシンIIの生理活性を中和する抗体は、過剰なアンギオテンシンIIによって引き起こされると考えられる疾患、例えば高血圧、心肥大、動脈硬化症、心筋梗塞症、腎糸球体硬化症などの循環系増殖性疾患における改善および治療に有効であることが期待できる。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らはアンギオテンシンノーゲンノックアウト動物を用い、KLHコンジュゲートアンギオテンシンIIを免疫原としてアンギオテンシンIIに結合するモノクローナル抗体を取得し、本発明を完成した。

【0006】 すなわち本発明は、アンギオテンシンIIと結合する抗体であって、酵素免疫測定法により生体内のアンギオテンシンIIを検出し得る結合性を有するモノクローナル抗体である。

【0007】 また、本発明はアンギオテンシンII活性を中和し得るモノクローナル抗体である。

【0008】 さらに本発明は、上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞等の動物細胞である。

【0009】 例えば、マウスにおけるモノクローナル抗体の作成は、非マウス蛋白由来分子を抗原分子として用いる。マウス由来の抗原を用いた場合には、その分子に対して既に免疫寛容が成立しているため抗原分子として認識されにくく、抗体ができにくいからである。

【0010】 ところで、アンギオテンシンIIの一次構造は哺乳動物に広く共通していることが知られている。し

たがって、たとえマウスにヒトのアンギオテンシンIIを免疫する場合であっても「非マウス蛋白由来の抗原」と考えるわけにはいかない。

【0011】この問題点を解決すべく、本発明者らはアンギオテンシンに対する免疫寛容が成立していないと考えられるマウス、すなわちアンギオテンシノーゲンノックアウトマウス（筑波低血圧マウス）を免疫動物として用いることを着想した。これを用いれば特異性の高い抗アンギオテンシンモノクローナル抗体を作成できるのではないかと考えたのである。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明のモノクローナル抗体は、例えば以下に述べる方法で調製することができる。すなわち、基本的には、GalfreおよびMilstein, *Methods in Enzymology*, 第73巻, Academic Press, New York (1981); James W. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, Orlando, Florida (1986); Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel等共編, Wiley-Interscience, New York (1987)等に記載されている方法である。

【0013】モノクローナル抗体を調製するためには、精製した抗原ペプチドを用いた方がよい。この精製ペプチドは抗体力価検定のためにも用いられる。本発明のモノクローナル抗体の調製に際して用いた抗原ペプチドの調製法は、実施例において詳述する。

【0014】次に、KLHに結合させたアンギオテンシンIIをアジュバントとともにノックアウト動物に腹腔内注射または皮下注射することを繰り返し、免疫応答を起こさせる。続いて、その免疫した動物からBリンパ球を取り出し、上記文献記載の方法で、無限増殖能をもつ動物細胞と細胞融合を行う。ノックアウト動物としてはノックアウトマウスが好ましい。また、融合の相手として好ましい細胞株はマウスの骨髓腫細胞であり、P3-X6.3-Ag8-U1ミエローマ細胞(ATCC CRL 1597)が特に好ましい。

【0015】細胞融合後は、常法に従い適当な選択培地で培養を続け、生残した細胞の中からアンギオテンシンIIに結合する抗体を産生している細胞株をELISA法等により選別する。さらに得られたモノクローナル抗体産生細胞について数回のクローニングを行い、単クローン性および抗体産生能の安定性のある株を選別することが望ましい。クローニング法としては、限界希釈法、軟アガロース法、およびセルソーターを用いた選別法等を用いることができる。

【0016】ヒトの治療に本発明のモノクローナル抗体を用いる場合には、ヒト型のモノクローナル抗体を用いることが望ましい。ヒト型のモノクローナル抗体には、ヒトのモノクローナル抗体のほか、いわゆるキメラ抗体、すなわち可変領域のみマウス等の動物由来のアミノ酸配列からなり、定常領域にはそれ以外の配列を用いた

ものも含まれる。この他、いわゆるCDRグラフトニング技術によるモノクローナル抗体、すなわち相補性決定領域のみ動物由来のアミノ酸配列からなり、それ以外の配列はすべてヒト由来のものであるものも、ここでいうヒト型のモノクローナル抗体に含まれる。

【0017】これらのキメラ抗体あるいはCDRグラフトニング技術によるモノクローナル抗体は、現在の遺伝子組換え技術によれば、本発明のモノクローナル抗体を産生するマウスのハイブリドーマから、それに対応する遺伝子を取り出してヒト抗体遺伝子と組み換え、動物細胞に導入して発現させることによっても容易に作製することができる。例えばInt. J. Cancer, 44, 424~433 (1989), Pro Natl Acad Sci USA, 87, 8095~8099 (1990)に記載のごとくである。また、アミノ酸配列を変えずに、モノクローナル抗体の産生効率向上を目的として、ハイブリドーマから取り出した本発明の抗体に対応する遺伝子を他の動物細胞において発現させることも可能である。本発明のモノクローナル抗体には、これらの遺伝子組換え技術によって得られるモノクローナル抗体およびそれを産生する動物細胞も含まれる。

【0018】ヒト型モノクローナル抗体の作製方法には、上記のほかに、ヒトのBリンパ球をヒトまたはマウスのミエローマあるいはヘテロミエローマと細胞融合する方法もある。ヒトのミエローマと細胞融合する方法としては、例えばJ. Immunol Methods, 61, 17~32 (1983)に、マウスのミエローマと細胞融合する方法としては、例えばProc Natl Acad Sci USA, 77, 6841~6845 (1980)に、ヘテロミエローマと細胞融合する方法としては、例えばProc Natl Acad Sci USA, 81, 3214 (1984)等に記載されている。これらの方法を実施するにあたっては、ヒトのBリンパ球を細胞融合する前に*in vitro*で刺激しておくほうがよい。その方法としては、例えばBiochem Biophys Res Commun, 135, 495 (1986)に記載の方法によればよい。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれにより何ら限定されるものではない。

【0020】【実施例1】

免疫用抗原ペプチドの調製

アンギオテンシンIIのN末端にシステインを有するペプチド（配列番号1）をペプチドシンセサイザー（アプライド バイオシステムズ モデル431A）にて化学合成した。この合成ペプチドを10mMリン酸緩衝液（pH7.5）に溶解し（10mg/mL）、10mgのマレイミド活性化ヘモシアニン（ベーリンガー・マンハイム バイオケミカル社製）と25℃で2時間インキュベートした後、反応溶液を10mMリン酸緩衝液（pH7.5）に対して透析し、免疫用抗原ペプチド溶液とした。

【0021】【実施例2】

血清抗体価測定用抗原ペプチドの調製

アンギオテンシンIIのN末端にシステインを有するペプチド(配列番号1)をペプチドシンセサイザー(アプライド バイオシステムズ モデル431A)にて化学合成した。この合成ペプチドを10mMリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解し(10mg/mL)、10mgのマレイミド活性化ウシ血清アルブミン(ペーリンガー・マンハイムバイオケミカル社製)と25℃で2時間インキュベートした後、反応溶液を10mMリン酸緩衝液(pH7.5)に対して透析し、血清抗体価測定用抗原ペプチド溶液とした。

[0022] [実施例3]

アンギオテンシンペプチドと反応するモノクローナル抗体の作製

実施例1で調製した抗原ペプチド、10μgをフロインドのコンプリートアジュバント(BACTO社製、1:1)とともに、2週間毎にアンギオテンシノーゲンノックアウトマウス(6週齢、オス)にi. p. 投与した。これを4回行なった後、5回目は細胞融合の3日前に上記混合物50μlをi. v. 投与した。

[0023] 細胞融合の直前にマウスを殺し、脾細胞をPBS中でホモジナイズし、残渣をナイロンメッシュで濾過後、PBSで遠心洗浄を1回行なった。この脾細胞 2×10^7 個をマウスミエローマ(P3-X63-Ag8-U1) 4×10^7 と常法(Kohler, Milstein; Nature, 256, 495~497 (1975))に従って細胞融合した。

[0024] すなわち、両細胞を混合後遠沈し、1mlの50%ポリエチレングリコール(和光純薬、2000) HAT培地(GIT培地、和光純薬)を2分間かけて滴下し、さらに5分間かけて10mlのHAT培地でポリエチレングリコールを希釈した後、最終的に同培地で100mlにしてから200μl/ウェルで96ウェルプレート5枚に分注した。5%CO₂、37℃で一週間培養後、半量(100μl/ウェル)を除去し、HT培地(GIT培地、和光純薬)を加えた(100μl/ウェル)。二週間後に以下に述べるBSAを結合させたアンギオテンシンIIをコートしたプレートによるスクリーニングを行なった。

[0025] すなわち、BSA結合アンギオテンシンIIの50mM NaCO₃緩衝液(pH9.5)溶液(1μg/mL)を96ウェルプレート(Falcon社、PVC製)に各ウェル当り50μlずつ分注し、37℃で1時間放置した。洗浄後、3%BSA/PBSを各ウェル当り200μl加えて37℃で1時間ブロッキングした。再度洗浄後、各ウェル当り50μlの培養上清を加え、室温で1時間放置し、0.05%Tween/PBSで3回洗浄した。

[0026] 次に、3%BSAおよび0.2%スキムミルクを含むPBSで2000倍に希釈したやぎ抗マウス

IgG-アルカリホスファターゼコンジュゲート(Tago社)をウェル当り50μl加え、室温で1時間放置した。再度洗浄し、0.25mMの塩化マグネシウムを含む1Mジエタノールアミン緩衝液(pH9.8)に溶解したp-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム塩(和光純薬)の1mg/mL溶液をウェル当り100μl加え、室温で30分間反応させた。この405nmにおける吸光度を、96ウェルプレート用のELISAリーダー測定器(Molecular Device社Vmax)を用いて調べ、アンギオテンシンIIと結合するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択した。

[0027] このように選択したハイブリドーマについて、限界希釈法によるクローニングを2回行ない、株化した。具体的にはマウス腹腔浸出細胞をHT培地中 10^6 個/mLの割合に調製したものを各ウェルに分注し、これにウェル当り0.5個の割合でHT培地に懸濁したハイブリドーマ細胞を播き込んだ。5%CO₂インキュベーター内で、37℃で2週間培養し、その培養上清について上記ELISA法でスクリーニングして単一コロニーをピックアップすることで株化を行なった。

[0028] [実施例4]

ハイブリドーマの培養および抗体精製

以上の操作で得られた抗体を産生するハイブリドーマ4クローン(CFK10C9、CFK11B5、CFK12A3、CFK15E101)をインシュリン、トランスフェリン、エタノールアミン、セレナイトを含む無血清培地であるeRDF培地(Gibco BRL社)に適応させて培養し、培養上清を回収した。培養上清中の抗体をプロテインGカラムで常法により精製した。

[0029] [実施例5]

抗アンギオテンシンIIモノクローナル抗体の特異性の検討

実施例4にて選択した抗アンギオテンシンモノクローナル抗体について実施例2で調製したBSA結合アンギオテンシンIIを使って抗原特異性の検討を行った。すなわち、BSA結合アンギオテンシンIIの50mM NaCO₃緩衝液(pH9.5)溶液(1μg/mL)を96ウェルプレート(Falcon社、PVC製)に各ウェル当り50μlずつ分注し、37℃で1時間放置した。洗浄後、3%BSA/PBSを各ウェル当り200μl加えて37℃で1時間ブロッキングした。再度洗浄後、各ウェル当り50μlの、3倍項比で希釈した培養上清($\times 1$ 、 $\times 1/3$ 、 $\times 1/9$ 、 $\times 1/27$ 、 $\times 1/81$ 、 $\times 1/243$ 、 $\times 1/729$)を加え、室温で1時間放置し、0.05%Tween/PBSで3回洗浄した。

[0030] 次に、3%BSAおよび0.2%スキムミルクを含むPBSで2000倍に希釈したやぎ抗マウスIgG-アルカリホスファターゼコンジュゲート(Tago社)をウェル当り50μl加え、室温で1時間放置

した。再度洗浄し、0.25 mMの塩化マグネシウムを含む1 Mジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) に溶解したp-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム塩 (和光純薬) の1 mg/ml 溶液をウェル当り100 μ l 加え、室温で30分間反応させた。この405 nmにおける吸光度を、96ウェルプレート用のELISAリーダー測定器 (Molecular Device社Vmax) を用いて調べた (図1参照)。

【0031】

【発明の効果】本発明のモノクローナル抗体を用いた診断薬、診断キットによれば、例えば血中のアンジオテンシンII濃度を測定することができる。例えば、本発明のモノクローナル抗体のうちの一つを96穴プレートに結合させたものと、市販ウサギ抗アンジオテンシンIIポリクローナル抗体とのサンドイッチエンザイムイムノアッセイを行えば、簡便にアンジオテンシンIIの検出、濃度の測定を行うことができる。また、本発明のモノクローナル抗体を治療薬として用いることにより、高血圧、心肥大、動脈硬化症、心筋梗塞症、腎糸球体硬化症などの循環系増殖性疾患の病態改善および治療に用いることができる。

【0032】

【配列表】

【0033】配列番号：1

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe

1 5

【図面の簡単な説明】

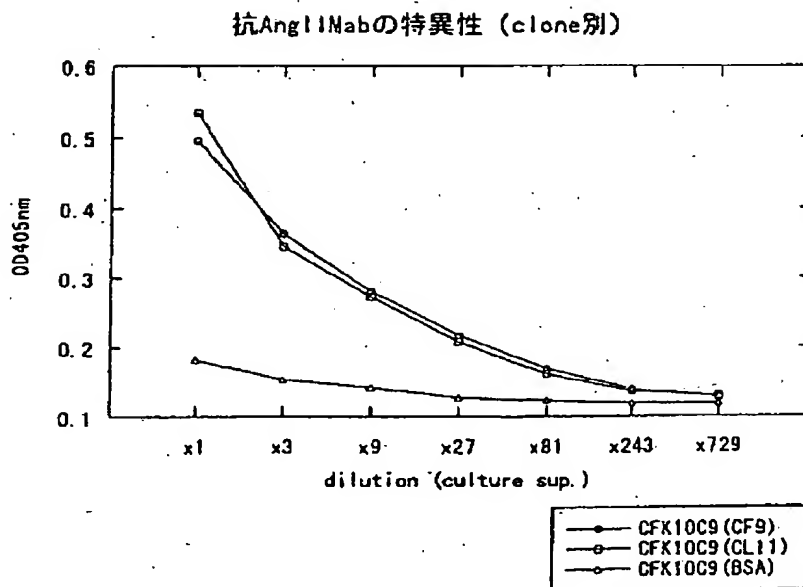
【図1】モノクローナル抗体CFK10C9の結合特異性を示す図。グラフの横軸は、加えたハイブリドーマ培養上清の量を表し、縦軸はBSA結合アンジオテンシンII結合プレートと反応したアンジオテンシンIIモノクローナル抗体の量を表す (以下同じ)。

【図2】モノクローナル抗体CFK12A3の結合特異性を示す図。

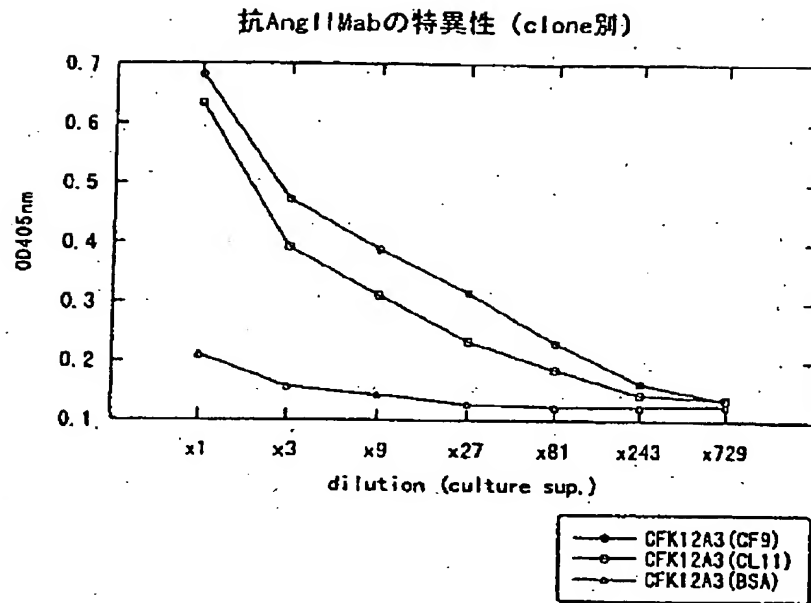
【図3】モノクローナル抗体CFK11B5の結合特異性を示す図。

【図4】モノクローナル抗体CFK15E10の結合特異性を示す図。

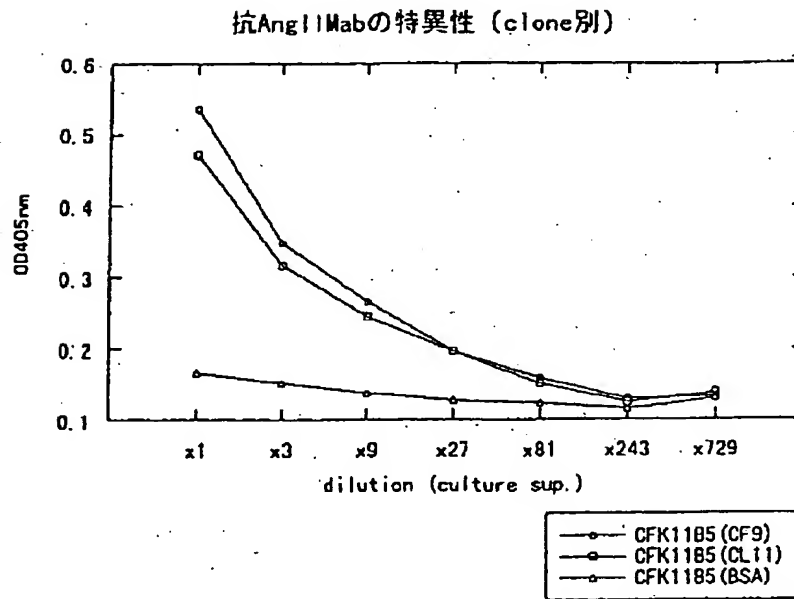
【図1】



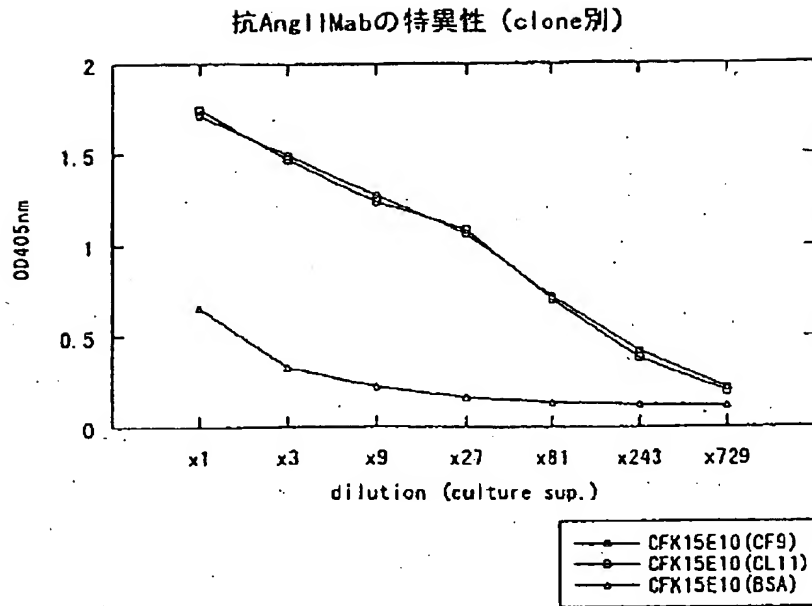
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
// C 1 2 P 21/08		(C 1 2 P 21/08	
(C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 P 21/08		15/00	C
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	
(72)発明者 残間 朗		Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA43 GA03 GA18
東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人			HA15
株式会社東京研究センター内			4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12
(72)発明者 上村 孝			DA01 DA13
東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人			4B065 AA91X AA92X AB05 AC14
株式会社東京研究センター内			BA08 BB32 CA25 CA44 CA46
			4H045 AA11 AA20 CA40 DA76 EA23
			EA50 FA72 GA26